(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel
[Vorsteher: Prof. Dr. J. Tomcsik].)

Zur Frage der bakteriologischen Diagnose der Tuberkulose durch das Kulturverfahren, mit besonderer Berücksichtigung des Dubosschen Nährbodens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Ernst Kürsteiner
von Gais (Appenzell A.-Rh.)

Basel 1950

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt
auf Antrag von Herrn Prof. Dr. J. Tomcsik

Tag der Promotion: 3. März 1949

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck aus
«Schweiz. Zeitschrift für Allgemeine Pathologie und Bakteriologie»
Vol. XIII, Nr. 3 (1950)

Zur Frage der bakteriologischen Diagnose der Tuberkulose durch das Kulturverfahren, mit besonderer Berücksichtigung des Dubosschen Nährbodens.

Dubos und seine Mitarbeiter (1, 2, 3, 4) beschrieben einen flüssigen Nährboden zur Züchtung von M. tuberculosis, dessen verhältnismäßig einfache Herstellung ihn für Routinezwecke prädisponiert.

Die wichtigsten Komponenten dieses Nährbodens sind Ölsäure (oder ein Ölsäure-Ester, bekannt unter dem Namen «Tween 80»), welche in ganz geringen Mengen das Wachstum von minimalen Inocula ermöglicht und fördert, und Albumin (fraction V of bovine albumine), das einerseits die Ölsäure so puffert, daß nur gerade wachstumsfördernde Mengen ständig frei werden (Ölsäure ist in größeren Mengen toxisch für die Bazillen) und andererseits ebenfalls einen günstigen Einfluß auf das Wachstum von M. tuberculosis ausübt (2, 3, 4). Diese zwei Substanzen werden einem synthetischen Grundnährboden, wie ihn z. B. *Kirchner* (5) oder *Lockemann* (6) beschrieben haben, beigefügt, und es soll damit ein rascheres und üppigeres Wachstum der Tuberkelbazillen erzielt werden, als es auf den bis dahin gebräuchlichen Nährböden der Fall war.

Die genaue Zusammensetzung dieses Nährbodens, auf welchem die folgenden Versuche basieren, ist (4):

Grund-Nährboden:

KH_2PO_4	1,0 g	in 100 ccm heißem Aqua bidest. lösen
Na_2HPO_4	6,3 g	
Asparagin	1,0 g	

Eingegangen: 1. 8. 1949.

Dann werden hinzugefügt:

Aqua bidest.	850 ccm	
Bacto-Casiton	1—2 g	(20—40 ccm einer 5%igen Stammlösung)
Ferriammon. citr.	0,005 g	(1 ccm einer 0,5%igen Stammlösung)
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,01 g	(1 ccm einer 1%igen Stammlösung)
$CaCl_2$	0,0005 g	(1 ccm einer 0,05%igen Stammlösung)
$ZnSO_4$	0,0001 g	(1 ccm einer 0,01%igen Stammlösung)
$CuSO_4$	0,0001 g	(1 ccm einer 0,01%igen Stammlösung)
Malachitgrün	1 : 300 000	(Endverdünnung)

pH einstellen (6,2—6,6),
sterilisieren im Autoklaven ¼ Stunde bei 0,5—1 atü.

Zu diesem Grundnährboden (900 ccm) wird nun gegeben:

1. Für Tween-Nährboden:
   2 ccm 10%iges Tween 80
   100 ccm 5%ige Albuminlösung (Seitz-filtriert)
2. Für Ölsäure-Albumin-Nährboden:
   100 ccm Ölsäure-Albumin-Komplex (Seitz-filtriert)
   (Ölsäure-Albumin-Komplex:
   5 ccm einer Suspension von 0,12 ccm Ölsäure in 10 ccm NaOH n/20 werden mit 95 ccm einer 5%igen Albuminlösung gemischt).

Gibt man zu dem Ölsäure-Albumin-Nährboden 1,5% Difco-Agar (vor dem Sterilisieren des Grundnährbodens — dann Hinzufügen des Ölsäure-Albumin-Komplexes bei ca. 50° C), so entsteht ein fester Nährboden, der, abgesehen von der einfachen Herstellung, den großen Vorteil hat, ganz durchsichtig zu sein, und der deshalb, in Petri-Schalen angelegt — unter dem Mikroskop bei 40—80facher Vergrößerung ohne Öffnen der Platten —, nach Kolonien abgesucht werden kann. Ein gleiches Vorgehen hat *Koch* (7) mit seinem Serum-Nährboden beschrieben, und er hat damals schon auf die auffälligen und charakteristischen Formen der Kolonien von M. tuberculosis hingewiesen, eine Tatsache, die auch *Dubos* (8) wieder beschreibt, und die hier bestätigt werden konnte: Die Tuberkelbazillen-Kolonien, und zwar besonders in ihren virulenten Formen, zeigen in der Tat einen so typischen Aspekt, daß mit Hilfe dieses neuen Nährbodens eine Diagnose auf virulente Form von M. tuberculosis aus der einfachen Prüfung unter dem Mikroskop mit schwacher Vergrößerung gemacht werden kann.

Nur in den Fällen, wo eine atypische und uncharakteristische oder keine Kolonie gefunden wird, muß ein gefärbtes Präparat und bei Vorhandensein von säurefesten Stäbchen eventuell zur

Sicherung der Diagnose ein Tierversuch gemacht werden. Diese Fälle dürften aber die selteneren sein, obwohl *Gernez-Rieux* und Mitarbeiter (9) eine Anzahl ihrer positiven Fälle — bei makroskopisch negativem Befund — nur mikroskopisch nachweisen konnten. Sie nehmen dabei einen unbekannten Inhibitionsfaktor an, der zwar ein initiales Wachstum, aber nicht ein Auswachsen der Kolonien bis zur makroskopischen Sichtbarkeit gestattet.

Weitere Versuche von *Dubos* (10) zeigten, daß auch hohe Konzentrationen von Penicillin im Ölsäure-Albumin- (nicht aber im Tween-Albumin-) Nährboden dem Wachstum der Tbc.-Bazillen keinen Einhalt tun und somit nicht nur in vivo, wie die meisten Chemotherapeutica, sondern auch in vitro gegenüber M. tuberculosis wenig oder nicht wirksam sind. Diese Tatsache ist für die Erstzüchtung aus mischinfiziertem Material besonders wichtig; denn vom Zusatz eines in diesem Fall so selektiv wirkenden (oder versagenden) Antibioticums ist zu erwarten, daß damit eine Vorbehandlung des Materials weitgehend überflüssig werde. Schon früher wurde Penicillin von *Friedemann* (11) in seinem Nährboden mit Hühnerembryozusatz verwendet.

Über erfolgreiche Erstzüchtungen mit dem *Dubos*-Nährboden berichten *Goldie* (12), der flüssigen Nährböden Penicillin zusetzte, und *Foley* (13), der mit dem neuen Nährboden (ohne Penicillin) und Vorbehandlung mit 3%igem HCl bei 143 untersuchten Fällen 96% der positiven Fälle mit Kultur und 93% mit dem Tierversuch (mit beiden 100%) fand.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Brauchbarkeit des von *Dubos* vorgeschlagenen Nährbodens zum Zwecke der Erstzüchtung von M. tuberculosis aus mischinfiziertem Material weiter zu untersuchen und abzuklären.

Arbeitsmethoden und Resultate.

Es wurde zuerst die Qualität des *Dubos*-Nährbodens in seiner flüssigen (Tween-Albumin) und festen (Ölsäure-Albumin-Agar) Form mit bekannten Tbc.-Laboratoriumsstämmen geprüft. Diese Stämme wurden auf flüssigem Tween-Albumin-Nährboden, welcher ein homogenes und diffuses Wachstum bewirkt, gezüchtet. Eine solche Tween-Kultur, welche nach *Dubos* (14) bei gutem Wachstum nach 7—10 Tagen pro ccm 10^8—10^9 Bazillen enthalten soll, wurde als Ausgangskonzentration gewählt, mit dem Unterschied, daß ungefähr gleich dichte Suspensionen verschie-

denen Alters verwendet wurden, um den Verhältnissen, wie wir sie bei der Untersuchung von pathologischem Material vor uns haben, eher Rechnung zu tragen. Dabei wird natürlich eine jüngere Kultur mehr lebensfähige Keime enthalten.

Von dieser Ausgangskultur wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen in Reagenzröhrchen mit physiol. Kochsalzlösung hergestellt, von jedem Röhrchen ein Kapillartropfen (= 0,02 ccm) auf einen flüssigen oder festen Nährboden gebracht und bei 37° bebrütet.

Aus einer Reihe verschiedener dieser Wachstumsversuche sind in den Tabellen I und II die Resultate von zweien wiedergegeben, wobei bei dem ersten eine 10tägige, bei dem zweiten eine 30tägige Kultur verwendet wurde. Es zeigte sich, wie erwartet, daß das Alter der Kultur offensichtlich eine Rolle spielt, indem der Agar-Nährboden, mit der 30 Tage alten Kultur beimpft, bei der Konzentration 10^{-5} kein Wachstum mehr zeigt. Daß im flüssigen Nährboden — bei beiden Versuchen — das Wachstum früher und rascher ist, darf nicht verwundern; denn es ist bekannt, daß die Austauschmöglichkeiten zwischen Mikroorganismen und Nährflüssigkeit optimale sind; es darf aber auch nicht dazu verleiten, aus diesem Grund den flüssigen Nährboden als für unsere Zwecke geeigneter erscheinen zu lassen: Neben dem großen Vor-

TABELLE I.

Wachstumsintensität auf zwei Variationen des *Dubos*-Nährbodens, geprüft mit verschiedenen Inoculum-Mengen einer 10tägigen Kultur von M. tuberculosis (Stamm *Vallée*).

Tage	Tween 80 (flüssig)					Ölsäure-Albumin (fest)				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
7	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	+	+	ø	ø
14	++	+	++	+	(+)	++	+	+	ø	ø
18	+++	++	++	+	(+)	+++	++	++	+	(+)
22	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	++

TABELLE II.

Wachstumsintensität auf zwei Variationen des *Dubos*-Nährbodens, geprüft mit verschiedenen Inoculum-Mengen einer 30tägigen Kultur von M. tuberculosis (Stamm *Vallée*).

Tage	Tween 80 (flüssig)					Ölsäure-Albumin (fest)				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
4	(+)	ø	ø	ø	ø	+	ø	ø	ø	ø
9	++	++	+	(+)	ø	++	(+)	(+)	ø	ø
14	+++	++	++	+	+	+++	++	++	+	ø
21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	ø

teil des festen Nährbodens, daß auf ihm in vielen Fällen die Kolonien sofort als solche von M. tuberculosis erkannt werden können, ist bei ihm auch der Faktor der Verunreinigung etwas leichter ins Gewicht fallend. Einzelne Kolonien von andern Bakterien oder kleine, begrenzte Pilzrasen stören nicht allzu stark, während, wie in vielen Fällen festgestellt werden konnte, eine Verunreinigung im flüssigen Nährboden diesen gänzlich unbrauchbar macht. — Bei der Konzentration von 10^{-4} ist auf beiden Nährböden nach 20 Tagen gutes bis üppiges Wachstum zu verzeichnen.

In einer zweiten Versuchsanordnung wurde der Einfluß eines Penicillinzusatzes auf das Wachstum der Tbc.-Bazillen untersucht und gleichzeitig die Frage, ob die von *Dubos* verwendete «fraction V of bovine albumine» durch Serum ersetzt werden könnte. Zwei Gründe waren für diese Frage maßgebend: Erstens ist das Albumin (von den «Armour Laboratories, Chicago» hergestellt) sehr schwer erhältlich und teuer, und neben einem leistungsfähigen sollte wenn möglich auch ein einigermaßen billiger Nährboden verwendet werden können. Zweitens zeigte es sich, daß ein pilzartiger, anaerob wachsender und Seitz-filtrierbarer Keim, der immer wieder die Nährböden, vor allem die flüssigen, verunreinigte, aus dem Albumin stammte.

Es wurden zu diesem Versuch drei Variationen des *Dubos*-Nährbodens (fester Nährboden) hergestellt:

1. Ein Ölsäure-Albumin-Nährboden nach Vorschrift.
2. Ein Ölsäure-Albumin-Nährboden wie 1, dem Penicillin in einer Menge von ca. 40 E./ccm zugesetzt wurde, und zwar, wenn der abkühlende Agar eine Temperatur von 45° erreicht hatte, um die Wirkung des Antibioticums nicht zu beeinträchtigen.
3. Ein Nährboden, dem an Stelle des Ölsäure-Albumin-Komplexes ein Ölsäure-Serum-Komplex zugesetzt wurde. (Es wurde bei der Nährbodenbereitung anstatt 100 ccm der 5%igen Albuminlösung ebensoviel reines Menschenserum verwendet.) Penicillinzusatz wie bei 2.

Diese 3 Nährböden wurden mit verschiedenen Inoculum-Mengen einer 7-tägigen Tween-Kultur von M. tuberculosis beimpft und bei 37° bebrütet.

Die Resultate aus Tabelle III, die den Durchschnitt von 2 Versuchen wiedergibt, zeigen, daß beide Fragen in positivem Sinne beantwortet werden können: Das von *Dubos* verwendete Albumin kann ohne Beeinträchtigung der Wachstumsintensität von M. tuberculosis durch Serum ersetzt werden, das leicht durch Seitz-Filter sterilisiert werden kann. Ein Zusatz von ca. 40 E.

Penicillin pro ccm Nährboden hat keinen irgendwie hemmenden Einfluß auf das Tbc.-Bazillen-Wachstum.

TABELLE III.

Züchtung verschiedener Inoculum-Mengen einer 7tägigen Kultur von M. tuberculosis (Stamm H37 RV) auf festen *Dubos*-Ölsäure-Nährböden bei Zusatz von Penicillin und Ersatz von Albumin durch Serum.

Tage	Albumin										Serum				
	ohne Zusätze					+ 40 E. ccm Penicillin									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
6	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
9	++	+	(+)	ø	ø	+	+	(+)	ø	ø	+	+	(+)	ø	ø
14	+++	+++	+	(+)	(+)	+++	+++	(+)	(+)	(+)	+++	+++	(+)	+	(+)
18	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+

Als vierte Frage, auf welche *Dubos* nicht näher eingegangen war, interessierte diejenige nach der Konzentration des Malachitgrüns. Während *Löwenstein* und *Hohn* in ihren Nährböden Malachitgrün in einer Endverdünnung von 1 : 10 000 verwenden, gibt *Dubos* eine solche von 1 : 300 000 an. Da eine möglichst hohe bakterizide Wirkung des Nährbodens erwünscht ist, wurde untersucht, ob eventuell auch im *Dubos*-Nährboden die Konzentration des Malachitgrüns erhöht werden könnte. Ein Vorversuch mit Malachitgrünkonzentrationen, die in Dreierpotenzen von 1 : 10 000 bis 1 : 270 000 dem Nährboden beigegeben worden waren, ergab, daß bei Konzentrationen über 1 : 30 000 eine vollständige Wachstumshemmung auftrat. Deshalb wurden zur Bestimmung einer genaueren Grenzverdünnung die Konzentrationsunterschiede kleiner gewählt:

Ölsäure-Serum-Penicillin- (O.S.P.-) Nährboden wurde (vor dem Sterilisieren des Agars) Malachitgrün in solchen Mengen zugefügt, daß Endverdünnungen von 1 : 350 000, 1 : 175 000, 1 : 90 000 und 1 : 45 000 entstanden. Die vier Nährbodenserien wurden mit einer Tbc.-Tween-Kultur in verschiedenen Verdünnungen beimpft und bei 37° bebrütet.

Die Resultate aus Tabelle IV zeigen, daß eine Malachitgrünkonzentration von 1 : 300 000 nicht wesentlich überschritten werden sollte. Kolonnen 1 und 2 zeigen zwar ungefähr dieselbe Wachstumsintensität, hingegen ist bei einer Konzentration von 1 : 90 000 das Endresultat nach 19 Tagen wohl dasselbe, jedoch das Wachstum am Anfang wesentlich langsamer und weniger üppig. Bei der Konzentration von 1 : 45 000 ist eine starke Wachs-

tumshemmung zu verzeichnen, die noch ausgeprägter war, als in der Tabelle zum Ausdruck kommt: die einzelnen Kolonien zeigten ein ausgesprochen dürftiges Wachstum und konnten im Vergleich zu den übrigen als deutlich geschädigt bezeichnet werden.

TABELLE IV.

Wachstumsintensität verschieden großer Inoculum-Mengen einer 10tägigen Kultur von M. tuberculosis (Stamm H37 RV) auf O.S.P.-Nährböden mit verschiedenen Konzentrationen von Malachitgrün.

Tage	Malachitgrünkonzentrationen 1 : 350 000					1 : 175 000					1 : 90 000					1 : 45 000				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
4	++	++	(+)	ø	ø	++	++	(+)	ø	ø	+	(+)	ø	ø	ø	(+)	ø	ø	ø	ø
7	+++	++	+	(+)	(+)	+++	++	+	(+)	ø	++	++	(+)	(+)	ø	+	(+)	ø	ø	ø
11	+++	+++	++	+	+	+++	+++	++	+	+	+++	++	++	+	(+)	++	(+)	(+)	ø	ø
19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	(+)	ø

Es wurde aus diesem Versuch geschlossen, daß dem Dubos-Nährboden die starken Pufferungs- oder Absorptionswirkungen der Eiernährböden abgehen, welche offenbar imstande sind, einen großen Teil des Malachitgrüns unwirksam zu machen, und wir haben die von *Dubos* vorgeschriebene Malachitgrünkonzentration nicht geändert.

Dieser O.S.P.-Nährboden wurde nun verwendet, um aus den im Untersuchungsamt des Institutes einlaufenden, auf Tbc. verdächtigen, aber im Direktpräparat negativen Materialien — parallel zum Tierversuch — Tbc.-Bazillen zu züchten.

Das pathologische Material wurde dabei direkt auf zwei bis drei Platten entweder mit der Öse ausgestrichen oder ausgespatelt (je nach Konsistenz), die Platten darauf mit einem Gummistreifen (aus Motorradpneu) verschlossen und bei 37° bebrütet.

Dabei konnte festgestellt werden, daß auf diese Weise keine brauchbaren Resultate zu erzielen waren: die Verunreinigung mit grampositiven und -negativen Stäbchen, besonders aber mit Pilzen war vor allem am Anfang derart, daß der größte Teil der Platten unbrauchbar wurde. Mit zunehmender Routine wurden die Resultate allerdings etwas besser, waren aber immer noch ganz ungenügend. Wir kamen daher zum Schluß, daß eine Vor-

behandlung der stark mischinfizierten Materialien wie Sputum, Magensaft, Urin unumgänglich sei. Bei der Suche nach einer geeigneten Vorbehandlung gingen wir von der Annahme aus, daß sehr starke Behandlungsmittel, welche den Tbc.-Bazillen nach neueren Erfahrungen (15) nicht unschädlich sind, bei dieser Art von selektivem Nährboden unnötig seien.

Drei Vorbehandlungsmethoden wurden schließlich in einer Reihe von Parallelversuchen geprüft, und zwar Behandlung mit

3%iger HCl, 3%iger NaOH, 5%iger Oxalsäure,

in einer kleineren Zahl von Versuchen auch noch eine Kombinationsbehandlung mit NaOH/HCl, und mit dem Vorgehen «ohne Behandlung» verglichen. Die Versuchsanordnung, bei welcher gleichzeitig der Einfluß der Behandlungsmethoden auf das Tbc.-Bazillen-Wachstum geprüft werden sollte, war folgende:

15—20 ccm negativen Sputums wurden mit einer Tween-Kultur von M. tuberculosis (Stamm H37 RV) versetzt, so daß sich eine Endverdünnung von 10^{-2} ergab, und gut gemischt. Dann wurden mit diesem künstlich positiv gemachten Material zwei Nährböden beimpft und der Rest in drei (später vier) gleiche Teile geteilt, mit den erwähnten Behandlungsmitteln zu gleichen Teilen gemischt und in große Zentrifugengläser gebracht. Diese wurden mit Gummistopfen verschlossen und in eine Schüttelmaschine (mit einer Frequenz von ca. 250/min) gebracht. Das Material wurde nun 2 Stunden geschüttelt (bei der komb. Methode mit jedem Behandlungsmittel eine Stunde), neutralisiert (als Indikator wurde Brom-Kresol-Purpur verwendet) und während ½ Stunde bei 3600—4000 Touren zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde bis auf ein paar Tropfen abgegossen, das Sediment mit steriler Pipette auf zwei Nährböden gebracht, ausgespatelt, die Platten verschlossen und bei 37° bebrütet.

Aus diesen Versuchen, deren Resultate in den Tabellen V und VI dargestellt sind, ging folgendes hervor:

1. Was die Verunreinigung mit Pilzen und Begleitbakterien anbelangt (Tabelle V):

Ein Beimpfen der Nährböden ohne Behandlung des Materials war nur in wenigen Fällen erfolgreich. Von den drei (bzw. vier) Vorbehandlungsmethoden waren diejenigen mit HCl, NaOH und mit der Kombination beider unter sich gleich gut und besser als die mit Oxalsäure.

2. Was die Beeinflussung des Tbc.-Bazillen-Wachstums durch die Vorbehandlung anbelangt (Tabelle VI):

Da die Hemmwirkung durch überwuchernde Begleitbakterien und Pilze und die Wachstumsintensität der Tbc.-Bazillen in um-

TABELLE V.

Intensität der Verunreinigung auf O.S.P.-Nährböden nach vier verschiedenen Behandlungsmethoden (Kontrolle ohne Behandlung).

Beh.-Meth.	Untersuchte Fälle	nach 8 Tagen					nach 16,5 Tagen				
		ø	+	++	+++	++++	ø	+	++	+++	++++
ohne Beh.	27	1	2	3	2	19	0	0	4	2	21
NaOH	30	23	3	3	0	1	18	6	3	1	2
HCl	30	23	5	1	1	0	20	4	3	2	1
Komb.	15	13	2	0	0	0	12	2	0	1	0
Oxalsäure	28	10	8	5	2	3	8	7	4	3	6

++++ = Verunreinigung so stark, daß Platte unbrauchbar ist.

TABELLE VI.

Intensität des Wachstums von M. tuberculosis (H37 RV) auf O.S.P.-Nährböden nach vier verschiedenen Behandlungsmethoden (Kontrolle ohne Behandlung).

Beh.-Meth.	Untersuchte Fälle	nach 8 Tagen					nach 16,5 Tagen					nach 25 Tagen				
		ø	(+)	+	++	+++	ø	(+)	+	++	+++	ø	(+)	+	++	+++
ohne Beh.	24	21	1	2	0	0	21	1	1	0	1	21	1	0	1	1
NaOH	24	23	1	0	0	0	10	7	4	3	0	0	4	4	3	13
HCl	24	18	4	1	1	0	6	2	3	6	7	0	4	3	5	12
Komb.	14	10	1	3	0	0	9	0	2	2	1	2	3	3	2	4
Oxalsäure	24	20	3	0	1	0	9	0	6	3	6	4	3	5	2	10

TABELLE VII.

Vergleich von Kultur und Tierversuch an 220 (bzw. 232) Fällen.

Art des Materials	Parallelversuche (Kultur *und* Tierversuch)				Nur Kultur	
	Anzahl der Fälle	Davon positiv	Positiv *nur* im Tierversuch	Positiv *nur* in der Kultur	Anzahl der Fälle	Davon positiv
Magensaft	61	14	3	1 (+1) *	1	—
Urin	64	12	3	1 (+1) *	5	1
Sputum	52	7	3	—	3	1
Pleurapkt.	28	7	—	4 (+1) *	3	2
Eiter	8	2	1	1 (+1) *	—	—
Gelenkpkt.	5	1	—	—	—	—
Probeexc.	1	1	—	—	—	—
Liquor	1	—	—	—	—	—
Total	220	44	10	5 (+4) *	12	4

* = Versuchstier interkurrent gestorben.

Es waren somit von 232 Kulturen 38 (= 16,3%) positiv
220 Tierversuchen 35 (= 15,9%) positiv

gekehrtem Verhältnis zueinander stehen, zeigten erwartungsgemäß die unbehandelten Platten das geringste und die mit HCl und NaOH vorbehandelten das beste Wachstum. In einzelnen Fällen, bei an sich geringer Verunreinigung, erwies sich die Oxalsäurebehandlung als milder, was in sehr üppigem Wachstum zum Ausdruck kam. Die kombinierte Behandlung zeigte stärkere Hemmwirkung als die übrigen.

Tabelle VII gibt einen Überblick über die Resultate der zweiten Hälfte aus 400 Untersuchungen, die zum größten Teil parallel zum Tierversuch ausgeführt wurden. Die Vorbehandlung erfogte bei diesen Fällen zuerst mit einer der 3 beschriebenen Methoden (NaOH, HCl und Kombination beider); später wurde nur noch HCl verwendet.

Die anfänglichen Paralleluntersuchungen waren wegen Verunreinigung der Kulturen durch fehlende Vorbehandlung und mangelnde Routine nicht statistisch zu verwerten; ich möchte daher besonders darauf hinweisen, daß Routine (die hier vor allem ihren Ausdruck in rascherem, sorgfältigerem und damit eher sterilem Arbeiten finden dürfte) einen großen Einfluß auf die Verbesserung der Resultate (d. h. hauptsächlich auf das Verhindern von Verunreinigungen) ausübt.

Bei den erwähnten Untersuchungen wurde wahllos alles Material aus dem Untersuchungsamt verarbeitet, das in genügender Quantität, um Tierversuch und Kultur machen zu können, vorhanden war; in einzelnen Fällen wurde auf Verlangen des Einsenders nur eine Kultur angelegt. Das Vorgehen war dabei folgendes: Material, das zum vornherein als wenig oder nicht mischinfiziert betrachtet werden konnte, wie Gelenkspunktate, Liquores, seröse Pleurapunktate usw., wurde unbehandelt auf 2—4 O.S.P.-Platten ausgespatelt, welche bei 37° bebrütet und innert 4—5 Wochen 3—4mal unter dem Mikroskop bei 40—80facher Vergrößerung nach Kolonien abgesucht wurden. Am Schlusse wurde von jeder Platte ein gefärbtes Präparat hergestellt und nach Tbc.-Bazillen abgesucht. — Mit den übrigen als mehr oder weniger stark infiziert betrachteten Materialien, wie Sputum, Magensaft, Urin, wurde eine Platte unbehandelt beimpft, der Rest des Materials wurde nach der oben beschriebenen Art vorbehandelt, indem die Menge des Behandlungsmittels sich nach Dichte und Zähigkeit des Materials richtete. (Es wurden nie weniger als 5 ccm genommen.) Vom entstandenen Sediment wurden 2—3 Platten

angelegt, welche wie oben beschrieben behandelt wurden. Der Grund, auch mit Material, das auf starke Verunreinigung verdächtig war, eine Platte unbehandelt zu beimpfen, war folgender: Sollte das Verhalten der Begleitbakterien derart sein, daß sie durch das Penicillin gehemmt werden, dann sind die Aussichten auf besseres und früheres Wachstum der Tbc.-Bazillen, die sich ganz ungeschädigt durch irgendwelche Behandlung entwickeln können, größer. In den andern, weitaus häufigeren Fällen können wir auf die Platten mit vorbehandeltem Material zurückgreifen.

Die Resultate aus Tabelle VII waren auch so, daß in einzelnen Fällen nur mit unbehandeltem, in andern nur mit behandeltem Material Tbc.-Kolonien nachzuweisen waren, und wir glauben, daß die Kombination eine möglichst große Ausbeute gestattet.

Zu den positiv ausgefallenen Kulturen ist zu bemerken, daß 29 der (38) Fälle direkt (unter der schwachen Vergrößerung des Mikroskopes) als virulente Kolonien von M. tuberculosis zu diagnostizieren waren; in 6 Fällen waren die Kolonien nicht ganz typisch, und es mußte das gefärbte Präparat die Diagnose klären, in 3 Fällen waren — in Übereinstimmung mit den Angaben von *Gernez* (10) — die Befunde makroskopisch negativ, und erst das gefärbte Präparat zeigte das Vorhandensein von Tbc.-Bazillen.

In 25 Fällen der Paralleluntersuchungen gingen die Meerschweinchen interkurrent zugrunde, 4 dieser Fälle zeigten positive Kulturen, während eine vollständige Verunreinigung aller Platten und damit Unbrauchbarkeit der Kultur in den beschriebenen Fällen nicht vorkam. Von 15 Fällen, wo nur Kultur verlangt worden war, waren 4 positiv. — Ferner zeigte sich, daß mit Tierversuch *und* Kultur von den 220 Fällen 44 (= 20%), mit Tierversuch allein 35 (= 15,9%) und mit Kultur allein 34 (= 15,5%) positive Fälle gefunden wurden, daß also die Kombination von Tierversuch und Kultur die Aussicht auf das Erfassen von möglichst vielen positiven Fällen erhöht.

Die hier gemachten Erfahrungen zeigen, daß der (leicht abgeänderte) Nährboden von Dubos auch zum Zwecke der Erstisolierung von M. tuberculosis aus pathologischem Material gute Dienste leistet, und er scheint mir dank seiner Vorteile berufen, das Kulturverfahren auch in kleineren Instituten zu einer Routinemethode werden zu lassen.

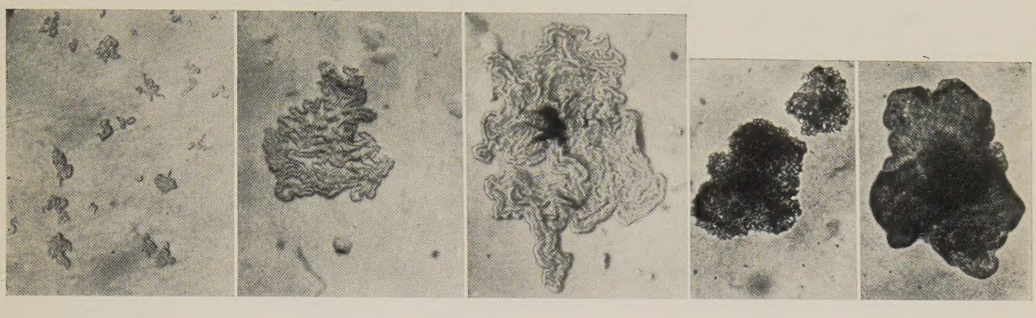

Abb. 1 *Abb. 2* *Abb. 3* *Abb. 4* *Abb. 5*

Abb. 1—5. Kolonien von M. tuberculosis auf O.S.P.-Nährboden bei 80facher Vergrößerung. 1—3. *Virulente Formen:* In jedem Alter zeigen die Kolonien einen auffälligen und charakteristischen Aspekt. 1 = 3—4 Tage. 2 = 2—3 Wochen. 3 = 4—5 Wochen. 4 und 5. *Avirulente Formen:* Die Kolonien haben kein ganz typisches, einheitliches Aussehen, differieren aber doch von Kolonien banaler Keime (2—3 Wochen).

Zusammenfassung.

Der neue Ölsäure-Albumin-Nährboden von Dubos zur Züchtung von Tbc.-Bazillen, der dank seiner Durchsichtigkeit häufig eine Diagnose auf Kolonien von M. tuberculosis (typisches Wachstum) ohne gefärbtes Präparat gestattet, wurde unter leichter Abänderung der Zusammensetzung (Ersatz des Albumins durch Serum, Zusatz von Penicillin) hinsichtlich seiner Eignung zur Erstzüchtung aus pathologischem Material mit dem Tierversuch verglichen (220 Fälle). Dabei zeigte sich, daß die Kombination beider Methoden mehr positive Fälle (20%) erfaßt als Tierversuch (15,9%) und Kultur (15,5%) für sich allein.

Résumé.

Le nouveau milieu de culture à l'acide oléique et albumine proposé par Dubos permet fréquemment sans l'aide de coloration le diagnostic des colonies de M. tuberculosis dont le mode de croissance est caractéristique. L'auteur se sert d'un milieu légèrement modifié (l'albumine est remplacée par du sérum, adjonction de pénicilline) pour la recherche du bacille de Koch directement à partir du matériel pathologique et compare ses résultats avec ceux de l'inoculation au cobaye (220 cas). Les deux méthodes combinées donnent des résultats positifs dans un nombre de cas plus élevé (20 %) que l'inoculation seule (15,9 %) ou la culture seule (15,5 %).

Riassunto.

Si è comparato il nuovo terreno di cultura per B. K., immediatamente prelevati da materiale patologico, di Dubos a base di acidi oleosi ed albumina, modificato (albumina sostituita con siero, aggiunta di penicillina), il quale permette spesso per la sua trasparenza di riconoscere le colonie del M. tuberculosis (crescenza tipica) senza bisogno di ricorrere al preparato colorato, con l'esame sull'animale (220 casi). I resultati mostrarono che la combinazione dei due metodi dà più risultati positivi (20%) che l'esame sull'animale (15,9 %) o le culture (15,5 %) individualmente.

Summary.

The results obtained in sputums and other pathological products with Dubos's new oleic-acid-albumin medium are compared with those obtained by guinea pig inoculations. Dubos's medium was slightly modified by the addition of penicillin and serum instead of albumin. In 220 cases examined the cultures revealed growth of M. tuberculosis in 15,5%, the guinea pig test was positive in 15,9%, the combination of the two methods gave 20% positive results.

Literatur.

1. *R. J. Dubos:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *58,* 361 (1945). — 2. *R. J. Dubos, Davis, Middlebrook* and *Pierce:* Am. Rev. Tbc. *54,* 204 (1946). — 3. *R. J. Dubos:* J. Exp. Med. *85,* 9 (1947). — 4. *R. J. Dubos* and *Middlebrook:* Am. Rev. Tbc. *56,* 334 (1947). — 5. *O. Kirchner:* Centralbl. Bakt. *124,* 403 (1932). — 6. *G. Lockemann:* Zschr. Hyg. Inf. *124,* 373 (1943). — 7. *R. Koch:* Berlin. klin. Wschr. *19,* 221 (1882). — 8. *R. J. Dubos:* J. Exp. Med. *86,* 175 (1947). — 9. *C. Gernez-Rieux* et al.: C. R. Soc. biol. *142,* 327 (1948). — 10. *R. J. Dubos* and *Kirby:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *66,* 120 (1947). — 11. *R. Friedemann:* Tubercle *26,* 75 (1945). — 12. *H. Goldie:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *65,* 210 (1947). — 13. *G. Foley:* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *62,* 298 (1946). — 14. *R. J. Dubos:* J. Exp. Med. *86,* 159 (1947). — 15. *Sula:* Zschr. Path. Bakt. *10,* 125 (1947).